

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10155459 A**

(43) Date of publication of application: **16 . 06 . 98**

(51) Int. Cl.

A23L 1/327
A23L 1/30
A23L 2/52
A61K 31/12
A61K 31/12
A61K 31/215
A61K 35/56
A61K 35/74
C07C403/02

(21) Application number: **08316479**

(22) Date of filing: **27 . 11 . 96**

(71) Applicant: **SUNTORY LTD ITANO REITOU
KK**

(72) Inventor: **MIKI WATARU
HOSODA KAZUAKI
KONDO KAZUO
ITAKURA HIROSHIGE**

(54) **ASTAXANTHIN-CONTAINING DRINK**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a drink and a medicine for preventing or suppressing arteriosclerosis, ischemic heart disease or ischemic encephalopathy through the mechanism protecting the oxidation of serum low-density lipoprotein(LDL).

SOLUTION: This drink having anti-oxidative action on

serum low-density lipoprotein(LDL) contains astaxanthin, a safe nature-derived material and/or its ester. A medicine for preventing or suppressing arteriosclerosis, ischemic heart disease or ischemic encephalopathy contains astaxanthin and/or its ester as active component.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-155459

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 2 3 L 1/327

A 2 3 L 1/327

1/30

1/30

A

2/52

A 6 1 K 31/12

ABN

A 6 1 K 31/12

ABN

ABS

ABS

31/215

ABX

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平8-316479

(22) 出願日

平成 8 年 (1996) 11 月 27 日

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 8 年 10 月 25 日
日本動脈硬化学会発行の「動脈硬化 第24巻 第 6 号」
に発表

(71) 出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 40 号

(71) 出願人 591265954

イタノ冷凍株式会社

徳島県鳴門市瀬戸町明神字式軒家33番地の
2

(72) 発明者 幹 渉

兵庫県神戸市兵庫区大開通 5 - 1 - 15

(72) 発明者 細田 和昭

東京都大田区大森東 2 - 9 - 1 - 1002

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスタキサンチン含有飲食物

(57) 【要約】

【課題】 血清中の低比重リポタンパク (LDL) の酸化を防止して、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防または抑制するための飲食物及び医薬を提供する。

【解決手段】 安全な天然由来の物質であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有する、血清中の低比重リポタンパク (LDL) 抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制するための医薬品。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルを添加してなる、血清中の低比重リポタンパク（LDL）の酸化を抑制または防止する作用を有する飲食物。

【請求項2】 アスタキサンチン及び／又はそのエステルが、天然物から得られたものである請求項1記載の飲食物。

【請求項3】 上記天然物から得られたものが、オキアミ抽出物である請求項2記載の飲食物。

【請求項4】 動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制のための請求項1ないし3のいずれか1項記載の飲食物。

【請求項5】 アスタキサンチン及び／又はその食用に許容されるエステルからなる、血清中の低比重リポタンパク（LDL）の酸化に対する抑制または防止を目的とする食品用の添加剤。

【請求項6】 アスタキサンチン及び／又はその薬学的に許容されるエステルを有効成分として含有してなる、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品。

【請求項7】 血清中の低比重リポタンパク（LDL）の酸化を抑制または阻止するための飲食物製造のためのアスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルの使用。

【請求項8】 動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防または抑制のための飲食物製造のためのアスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルの使用。

【請求項9】 動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防または抑制のための医薬品製造のためのアスタキサンチン及び／又はその薬学的に許容されるエステルの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】本発明は、アスタキサンチン及び／又はそのエステルからなる、血清中の低比重リポタンパク（LDL）抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品に関するものである。アスタキサンチン及び／又はそのエステルを天然有効成分として、その安全性やヒト血清中の低比重リポタンパク（LDL）の酸化防止能力により、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制のための機能性食品及び医薬品として利用することができる。

【0002】

【従来の技術】従来、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の抑制方法としては、食事療法、運動療法及び薬物療法が用いられてきた。使用される薬物はHMG-

CoA還元酵素阻害薬、プロブコール、陰イオン交換樹脂製剤、フィブラート系薬剤及びニコチン酸製剤の5つのグループに大別できる。これらを単独で使用するか、治療困難な場合は複数の薬剤の組み合わせで治療を行ってきた[竹村ら、医学のあゆみ、173、452（1995）]。しかし、各患者の病状が極めて多様であり、特に予防の観点で考慮できる方法に優れたものがあまりないのが現状である。

【0003】一方、動脈硬化症の発症及び進行は、ヒト血清中の低比重リポタンパク（LDL）の酸化変性と関連することが知られているが、最近、LDLの酸化変性の受けやすさを指標とする動脈硬化症診断法が開発され（近藤和雄ら、活性酸素と医食同源、共立出版、308頁、1996）、LDL酸化変性度と動脈硬化との間に負の相関性があることが確認されている。このような方法を指標として血清LDLの酸化を効果的に防止できる化合物が得られれば、現在使用されている医薬品とは全く異なった機構で、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を抑制することができ、特に天然物からこのような化合物が得られれば、これらの疾患の予防の観点から利用価値は極めて高い。しかしながら、このような化合物は現在、得られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、血清LDLの酸化を効果的に防止し、しかも安全性が高い物質を探索し、食品添加物または医薬品の有効成分として提供することを目的とする。

【0005】本発明の別の課題は、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を、現在使用されている治療剤とは全く異なった機構で予防又は抑制するために、血清LDLの酸化を効果的に防止できしかも安全性の高い物質を添加した飲食物、およびそのような物質を有効成分とする医薬品を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは自然界より、LDLの酸化を防止する活性（以下、LDL抗酸化活性という）を示し、かつ安全性に優れた化合物を鋭意探索した結果、カロテノイドの一種として公知であるアスタキサンチン及びそのエステルが、非常に強力なLDL抗酸化活性を示すことを発見した。多数あるカロテノイドのうち、アスタキサンチン及びそのエステルが特に強力なLDL抗酸化活性を示したことは驚くべきことである。

【0007】本発明者らはさらに、アスタキサンチンには突然変異原性が観察されず、安全性が高いことも確認した。本発明は、これらの新知見と、LDLの酸化変性が動脈硬化の重要な要因であるという知識に基づいて完成されたものである。

【0008】従って本発明は、アスタキサンチン及び／又はそのエステルを添加してなる、血清中の低比重リポ

タンパク（LDL）抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品を提供する。アスタキサンチンは、主として魚類への体色改善剤や家畜への色調改善添加剤として（例えば特開昭57-206342、特開昭60-54647又は特開平4-63552）利用されているが、血清LDLの酸化を防止する目的で、食品に添加しあるいは医薬品の有効成分として用いることは従来知られていない。

【0009】本発明の飲食物及び医薬品の有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、飲食物又は医薬品が体内に取り込まれたときアスタキサンチン及び／又はそのエステルが血清中のLDL抗酸化作用を示すための有効量、例えば、1日摂取量あたり1～100mg、好ましくは1～20mg含まれているが、その上限には特別な制限は存在しない。

【0010】本発明の有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、甲殻類の甲殻及び卵 [Kuhnら、Angew. Chem., 51, 465 (1938)又はBer., 71, 1879 (1938)]、臓器 [Kuhnら、Ber., 72, 1879 (1939)]、福寿草や金鳳花の花弁 [Seyboldら、Nature, 184, 1714 (1959)]、種々の魚介類の皮 [Matsuno、Carotenoids Chemistry and Biology, Plenum Press, 59 頁, 1989]、卵 [Mikiら、Comp. Biochem. Physiol., 71B, 7 (1982)]、ナンキョクオキアミ [Yamaguchiら、Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49, 1411 (1983)]、緑藻ヘマトコッカス [Renstroemら、Phytochemistry, 20, 2561 (1981)]、赤色酵母ファフィア [Andrewesら、Phytochemistry, 15, 1003 (1976)]、海洋性細菌 *Agrobacterium aurantiacum* [Yokoyamaら、Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1842 (1994)] などより発見されているもので、その化学構造は決定され [Andrewesら、Acta Chem. Scand., B28, 730 (1974)]、また有機合成法も確立しているところから [Widmerら、Helv. Chem. Acta, 64, 2405 (1981)およびMayerら、Helv. Chem. Acta, 64, 2405 (1981)]、化学合成品としても入手は容易である。

【0011】したがって、その供給源には特に制限はなく、例えば、化学的に合成されたアスタキサンチンでも、またアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有する天然物から分離したものであってもよく、具体的には赤色酵母ファフィア、緑藻ヘマトコッカス、海洋性細菌等を適当な培地で培養し、その培養物から抽出したもの、あるいはナンキョクオキアミ等から抽出したもの等を挙げることができる。これらの抽出物は、有機溶媒、好ましくはエタノールやアセトンを用いて抽出された抽出エキスの状態であっても良く、またこの抽出エキスを必要に応じて適宜精製したものであってもよい。

【0012】参考のため、以下に赤色酵母ファフィア (*Phaffia rhodozyma*) を適当な培地で培養し、その培

養物から抽出エキスを得る方法、並びにアスタキサンチン又はそのエステルを精製する方法を例示する。

【0013】赤色酵母ファフィア (*Phaffia rhodozyma*) を用いて、アスタキサンチン及びそのエステルを製造する際に使用される培地は、液体及び固体のいずれでもよいが、通常は液体培地による振とう培養または通気攪拌培養が有効である。培地は赤色酵母が生育して菌体内にアスタキサンチン及び／又はそのエステルを蓄積するものであればよい。すなわち、炭素源としては、例えばグルコース、ラクトースなどの糖類、グリセリン、デンプン、有機酸類などが、また窒素源としては、例えばペプトン、カザミノ酸などのタンパク質加水分解物、肉エキス、酵母エキス、大豆粕、アミノ酸類、アンモニウム塩、硝酸塩その他の各種窒素化合物が用いられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、塩化ナトリウムを添加しても良く、また、菌体の生育促進のため各種ビタミン類、ミネラル類、核酸関連化合物などの添加も可能である。

【0014】培養にあたっては、直接本培養を行わず、予め小規模な前培養を行って得られる培養物を本培養用培地に接種するのが望ましい。培養時の温度、期間、液性などは本発明化合物の蓄積量が最大になるように適宜選択、調節されるが、多くの場合、好気条件下で15℃～30℃、3～7日の培養でよく、また培地の液性はpH4.0～9.5に保つのがよい。

【0015】かかる培養により、菌体内にアスタキサンチン及び／又はそのエステルが生産、蓄積される。したがって液体培地を用いた場合、培養物を一旦濾過あるいは遠心分離して菌体を回収後、数度水で洗浄する。この様にして得られた菌体を物理的手法を用いて破碎した後乾燥する。乾燥菌体より目的化合物の分離、精製はアスタキサンチン及び／又はそのエステルの化学的特性に基づいて種々の手法が選択可能である。すなわち、各種の高極性有機溶媒による抽出や溶解が選択されるが、好ましくはエタノール又はアセトンを用いた菌体抽出である。溶媒量は通常乾燥菌体に対して3～5倍量が好ましく、室温にて数時間の攪拌による抽出を2～3回繰り返せば充分である。次いでこの抽出液を合一し、40℃以下で減圧濃縮するとアスタキサンチン及びそのエステルを含む油状の粗抽出エキスが得られる。本抽出エキスを含有されるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは用いる溶媒等の諸条件によって変動するが、通常1～10%程度である。

【0016】さらにこの粗抽出エキスからヘキサンなどの低極性有機溶媒を用いた不純物の除去、ゲル濾過、各種イオン交換体を用いたイオン交換クロマトグラフィー、シリカゲル、シアノプロピル、アルミナなどを担体とする吸着クロマトグラフィーなどを有効に用いて精製を行い、これらの手段の組み合わせにより本発明物質は単離される。ただし、これら以外の方法でも本発明物質

の特性を有効に利用できるものであれば適宜利用可能である。なかんづく、ダイヤイオンHP-20、コスモシルC18-AR、コスモシル5CN-20の組み合わせを好ましいものとして挙げることができる。

【0017】またアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有するオキアミ抽出物を得る方法として、特開昭60-4558号公報には、オキアミの生体またはそれらの乾燥体を、アセトン、n-ヘキサン、酢酸エチル等の有機溶剤で浸漬し、色素を溶出した溶剤抽出液について、そのpHを中性にした後、リパーゼあるいはアルカリを添加して脂肪酸その他のきょう雑物を分解し、これを超臨界ガス抽出あるいは分子蒸留し、又は希アルカリを用いて洗浄することを特徴とする黄色～赤橙色素アスタキサンチンの製造方法が、また特開昭61-281159号公報には、オキアミの乾燥体から、アセトン、n-ヘキサン等の有機溶剤で抽出された粗色素液について、色素以外の不飽和脂質を触媒で選択的に水素添加した後、リパーゼを添加して脂質を加水分解し、遊離した脂肪酸を尿素付加及び又は分子蒸留で除去し、必要であればさらにカラムクロマトグラフィーにより濃縮、精製することを特徴とする橙色素アスタキサンチンの製造方法が開示され、さらに、山下栄次：食品と開発 vol.27 No.3 (通巻409号) p38～40 (1992)には、オキアミの有機溶剤抽出物または超臨界抽出物について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行うことによって、アスタキサンチンジエステル、モノエステル及び遊離のアスタキサンチンを分離することができること、特開平5-155736号公報には、HPLCを行うことによってトリグリセリドや極性脂質などが除去でき、色素濃度を飛躍的に上げることができ、また海産物特有の臭いの元となる物質も除去されること、そしてカラムに充填する固定相となる吸着剤は例えばシリカゲル、ケイ酸、活性アルミナなどがあり、移動相となる低極性溶剤としては例えばn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどがあり、極性溶剤としては例えばアセトン、酢酸エチル、メタノールなどがあり、色素の精製には、まずn-ヘキサンでトリグリセリドなどの低極性脂質を溶出させ、次にn-ヘキサン中のアセトンの含有を増す (アセトン含量は約0.1～20%アセトン/n-ヘキサンの範囲) ことにより色素を溶出回収することが記載されており、いずれの方法を用いてもよい。

【0018】アスタキサンチンのエステルは、食用あるいは医薬用として許容される任意の脂肪酸とのエステルであり、例えばパルミチン酸、ステアリン酸等の飽和脂肪酸、あるいはオレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の不飽和脂肪酸のエステルが挙げられ、これらがアスタキサンチンに1つ結合したモノエステル及び2つ結合したジエステルのいずれも本発明に使用できる。

【0019】本発明の有効成分を食品又は医薬品として利用する場合、上記の粗抽出エキスあるいは精製品のいずれを使用することもできる。これらを使用する場合、アスタキサンチンおよびそのエステルの性状は油状であるところから、常法にしたがって有効成分を浮剤化あるいはシナジストとなるような化合物を加えて浮剤化することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】次に、本発明の飲食物及び医薬品の組成及び製剤について説明する。本発明における有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは化学的に合成されたものでも天然物由来のものでもよく、これらを単独あるいは適宜組み合わせて使用可能である。アスタキサンチンあるいは粗抽出エキスはエタノールに溶解し、そのまま水で希釈して使用することも可能であるが、必要に応じて乳液状製剤を調製することができる。乳液状製剤の調製にあたっては、水相部に没食子酸、L-アスコルビン酸 (あるいはそのエステルまたは塩)、ガム質 (例えばローカストビーンガム、アラビアガムまたはゼラチン等)、さらにビタミンP (例えばヘスペリジン、ルチン、ケルセチン、カテキン、シアニジン等のフラボノイド類またはポリフェノール類あるいはその混合物) 等を、また油相部にはアスタキサンチンあるいはそのエステル、粗抽出エキス、またはその混合物を添加し、さらにグリセロール、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、デキストリンまたは油脂、例えばナタネ油、大豆油、コーン油等通常の液状油を加えて乳化することによって容易に調製できる。乳化に際しては、拘束攪拌機、ホモジナイザー等を用いて混合乳化が可能である。

【0021】また、本発明の医薬として、錠剤及び粉末のような固形投薬形態、あるいはエリキシロール、シロップ及び懸濁液のような液体投薬形態で経口投与される。また非経口投与的に、例えば注射剤、座薬としても使用可能である。これらの医薬活性成分としてはアスタキサンチンは化学合成品でも天然物由来のアスタキサンチンあるいはそのエステル又は粗抽出エキスでもよく、これらを単独でもしくは適宜混合して用いられる。経口投与薬として使用する場合の補助剤としては、例えば固形粉末上の担体、ラクトース、サッカロースなどの糖、グリシンなどのアミノ酸、セルロース等が挙げられる。また潤滑剤として二酸化珪素。タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール等、結合剤としてデンプン、ゼラチン、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が例示できる。崩壊剤としてはデンプン、寒天等がある。

【0022】本発明の医薬中に含まれるアスタキサンチンまたはそのエステル (有効成分) の量は、成人に対して1日あたり、普通1mg～100mg、好ましくは1mg～20mgの服用量で経口投与を行うか、あるいは非経口投

与を行うことができる量である。投与量は、投与される疾患の種類、患者の年齢、体重、症状の程度、投与形態によって異なることは明らかである。本発明の有効成分は、血清LDL抗酸化作用を有するため、動脈硬化や、狭心症、心筋梗塞等の虚血性心疾患や脳梗塞等の虚血性脳障害等に対し有効である。

【0023】また本発明の飲食物の形態としては、マーガリン、バター、バターソース、チーズ（ナチュラル、プロセス）、生クリーム、ショートニング、ラード、アイスクリーム、ヨーグルト、コーヒー用ミルク、乳製品、ソース、スープ、肉製品、魚製品、ポップコーン、フライドポテト、ポテトチップ、ふりかけ、だて巻き、和菓子類（せいべい等）、洋菓子類（プリン、ゼリー、グミキャンディー、キャンディー、ドロップ、キャラメル、チョコレート、チューインガム、ペストリー等）、焼き菓子類（カステラ、ケーキ、ドーナッツ、ビスケット、クッキー、クラッカー等）、マカロニ、パスタ、サラダ油、インスタントスープ、ドレッシング、卵、マヨネーズ、みそ、炭酸系飲料、非炭酸系飲料（果汁飲料、ネクター飲料等）、清涼飲料、スポーツ飲料、茶、コーヒー、ココアなどの非アルコール飲料、リキュール、薬用酒等のアルコール飲料等の一般食品の形態を挙げることができる。

【0024】本発明の飲食物は、アスタキサンチン及び／又はそのエステル、もしくはこれらを含む天然物から得られたものを、一般食品の原料とともに配合し、通常の方法により加工製造することができる。その配合濃度は剤形、食品の形態性状により異なるが、一般には0.001～10%が好ましいが特に限定されるものではない。ただし最終製品の1日摂取量あたり、本発明の有効成分が、アスタキサンチンとして血清中のLDL抗酸化作用を発揮するのに必要な量だけ含まれるように調製する。現在知られている限り成人1日摂取量あたり1～50mg、好ましくは1～20mgが好ましいが、そのような量は、当業者が適宜選択できる。

【0025】本発明の飲食物を栄養補助食品あるいは機能性食品として用いる場合、その形態は、上記医薬製剤と同様の形態でもよいが、例えば蛋白質（蛋白質源としてはアミノ酸バランスのとれた栄養価の高い乳蛋白質、大豆蛋白質、卵アルブミン等の蛋白質が最も広く使用されるが、これらの分解物、卵白のオリゴペプチド、大豆加水分解物等の他、アミノ酸単体の混合物も使用される）、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等が配合された自然流動食、半消化態栄養食および成分栄養食や、ドリンク剤、カプセル剤、経腸栄養剤等の加工形態であってもよい。スポーツドリンクあるいは栄養ドリンクとして提供する場合は、栄養バランスを整え、かつ摂取時の風味を一層よくするため、易消化性の含水炭素、アミノ酸、ビタミン類、ミネラル類等の栄養的添加物や甘味料、香辛料、香料、色素等を配合するこ

ともできる。

【0026】本発明の栄養補助食品あるいは機能性食品の形態は、これらに限定されるものではなく、上記の一般食品の形態であってもよいが、できれば単位服用形態にあることが望ましい。

【0027】

【実施例】以下、実施例及び参考例を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0028】

10 【参考例1】 赤色酵母ファフィア (*Phaffia rhodozymba*) の培養によるアスタキサンチン及びそのエステル粗抽出エキスの製造

酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%及びグルコース1.0%からなる液体合成培地を坂口フラスコに100mlづつ5本に分注し、120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これに赤色酵母ファフィア (*Phaffia rhodozymba*) ミラー株(ATCC-24201株)の純粋培養物を一白金耳接種し、25℃で72時間往復式振とう器を用いて培養した。次いで酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%及びグルコース1.0%からなる液体合成培地25lを50lのジャーファーメンターに入れ、120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これに上記の前培養液500mlを接種し、25℃で48時間、12l/min通気攪拌培養した。その後、さらに1%分のグルコースを追加し、さらに48時間培養を行った。得られた培養液を遠心分離し、湿重量で約600gの菌体を得ることができた。かかる方法で得られた菌体を凍乾乾燥後、5倍量のアセトンを加え、超音波処理を行いつつ抽出した。濾過法にて残渣を分別し、500mlのアセトンを加えて同様に抽出を実施し、かかる操作を3回繰り返した。得られた赤色アセトン抽出液を全て合し、30℃で減圧濃縮することによりアスタキサンチン及びそのエステルの粗抽出エキスを得た。

30 【0029】本粗抽出エキスを、少量のジクロロメタンに溶解し、シリカゲルを担体とする吸着クロマトグラフィーを実施し、10%酢酸エチル含有ジクロロメタンを用いて展開して主成分の赤色色素画分を分取した。さらにこの成分をナカライテスク社製5CN-20を担体とする高速液体クロマトグラフィーに付し、ヘキサン/ジクロロメタン/エタノール/N-エチルジイソプロピルアミン (80:20:0.5:0.5) を移動相として用いてアスタキサンチンを最終的に分離した。収率はファフィア乾燥粉体1gあたり約6mgであった。

【0030】

40 【実施例1】 アスタキサンチンのLDL抗酸化活性 (in vitro) : アスタキサンチンのV-70 (アゾ化合物) の引き起こすヒト血清LDL酸化反応に対する阻害作用 V-70 [2,2'-アゾビス (4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)] の引き起こすヒト血清LDL酸化反応をアスタキサンチンがいかに防止するかを以下のようにして測定した。

【0031】まず、ヒト血清より100,000rpm、40分、4℃の条件で超遠心を行ってLDL画分を分取した。次いでMicro BCA法を用いてタンパク量を測定後、リン酸緩衝液を用いてタンパク量が70μg/mlになるようにLDL分画を調製した。アスタキサンチンを12.5、25.0、50.0μg/mlの濃度になるように調製してLDL分画に添加し、さらにV-70を400μM添加後、37℃に温度を保ちつつ234nmにおける吸光度を経時的に測定した。酸化により共役ジェンが生成されるまでの時間をラグタイムと定義し、アスタキサンチンを添加せず、代わりにリン酸緩衝液を同量添加したものをコントロールとしてアスタキ*

*サンチン添加によるラグタイムの延長をLDL抗酸化活性とした。なお本実験で用いたアスタキサンチンは、海洋性細菌*Agrobacterium aurantiacum*菌体より、Yokoyamaら、Biosci, Biotech. Biochem., 58, 1842 (1994)の方法で抽出、精製したものを使用した。結果を表1及び図1に示す。アスタキサンチンは、濃度依存的に1.6-3.3倍にラグタイムを延長し、明らかなLDL抗酸化活性を示した。

【0032】

【表1】

表1

アスタキサンチンのヒトLDL抗酸化活性

ラグタイム (分)	
コントロール	19.9
12.5 μg/ml	31.5
25.0 μg/ml	45.4
50.0 μg/ml	65.0

【0033】

【実施例2】 アスタキサンチンのLDL抗酸化活性

(ヒト介入試験)：アスタキサンチンのヒト投与によるV-70 (アゾ化合物) の引き起こす血清LDL酸化反応に対する効果

アスタキサンチンを健康人に投与し、得られた血清より得たLDLに対し、V-70の引き起こす酸化反応にどのような効果及ぼすかを以下のようにして測定した。

【0034】まず、健康者13名を対象とし、一定の食事を摂取させ、2週間、アスタキサンチンをそれぞれ3.6、7.2mg/日を5名、14.4mg/日を3名にソフトカプセルに封入し、経口投与した。投与前後の血清を採取し、100,000rpm、40分、4℃の条件で超遠心を行ってLDL画分を分取した。次いでMicro BCA法を用いてタンパク量を測※

※定後、リン酸緩衝液を用いてタンパク量が70μg/mlになるようにLDL分画を調製した。強制酸化剤としてV-70を400μM添加後、37℃に温度を保ちつつ234nmにおける吸光度を経時的に測定した。アスタキサンチン投与前後のラグタイムを比較し、アスタキサンチンの効果を検討した。なお本実験ではアスタキサンチンとして、オキアミから抽出精製されたイタノ冷凍 (株) のASTAX 1700 (1kgあたりアスタキサンチンジエステル1.7mg含有) を使用した。結果を表2及び図2に示す。アスタキサンチンは、有意にラグタイムを延長し、in vivoにおいても明らかなLDL抗酸化活性が認められた。

【0035】

【表2】

表2

アスタキサンチン負荷による
ヒトLDLの酸化に対する効果

負荷量 (mg/日)		ラグタイム (分)		
		負荷前	負荷後	
3.6	(n=5)	48.1±3.2	60.7±5.0	p<0.05
7.2	(n=5)	45.4±8.3	54.3±6.9	p<0.05
14.4	(n=3)	35.7±4.7	50.8±1.4	p<0.05

【0036】

【参考例2】 アスタキサンチンの抗変異原性試験

エイムス/サルモネラテスト (プレインクベーション法) にてアスタキサンチンの抗変異原効果を調べた。用いた菌株はサルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA102株で、本株はブレオマイシンやア

ルデヒド類等のフリーラジカルを生成する変異原に対して感受性の高いものである。陽性対照としてはマイトマイシンC (MMC) を用いた。また、溶媒対照としてはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。試料としてはアスタキサンチン単独、及びアスタキサンチンにMMCを加えたものの2種類とした。それぞれの試料はアスタキサン

チンの濃度を最高5mg/プレートとし5段階の濃度について検討した。

【0037】まず、アスタキサンチンのDMSO溶液を滅菌小試験管に分注し（アスタキサンチン単独の試料は100 μ l、それ以外は50 μ l）、アスタキサンチン単独以外の試料にはMMCを最終量が0.5 μ l/プレートになるように50 μ l加えた。次いでそれぞれにリン酸緩衝液（pH7.4）を0.5ml、前培養した菌懸濁液を0.1ml加えた。これらを振とう培養恒温槽を用い、37℃で20分間振とうしながらブレインキョベートし、軟寒天を2.5ml加え、泡が生じないように混合後、最少グルコース寒天培地に注ぎ一様にプレート上に広げた。これを37℃で2日間インキョベートした後、プレート上でテスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べ、復帰突然異変により生じたコロニー数（図3）を数えた。

【0038】その結果、アスタキサンチン自体には突然変異原性は全く認められなかった。一方、陽性対照であるMMCに対する抗変異原性は、最高濃度5mg/プレートするとき変異原性を34.5%抑制し、その効果が確認された。

【0039】

【製剤例1】 乳化状製剤

油相部	(重量%)
アスタキサンチン	0.1
ナタネ油	39.9
コハク酸グリセリド	2.0
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0
没食子酸	1.0
ケルセチン	1.0
ローカストビーンガム	0.1
水	53.9

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とケルセチンを混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、攪拌後ホモジナイザーを通し、均質化し10℃まで冷却して上記配合の乳化状製剤を得た。この乳化状製剤は、1回あたり約1～20ml飲用する。

【0040】

【製剤例2】 乳化状製剤

油相部	(重量%)
アスタキサンチン	0.1
ナタネ油	38.9
クエン酸モノグリセリド	2.0

*

呈味：DL-酒石酸ナトリウム

コハク酸

甘味：液糖

酸味：クエン酸

ビタミン：ビタミンC

アスタキサンチンエチルエステル

1 g

0.09 g

8 Kg

120 g

100 g

10 g

* 水相部

L-アスコルビン酸	2.0
没食子酸	1.0
ヘスペリジン	1.0
ローカストビーンガム	0.05
水	54.95

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とヘスペリジンを混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、攪拌後ホモジナイザーを通し、均質化し10℃まで冷却して上記配合の乳化状製剤を得た。この乳化状製剤は、1回あたり約1～20ml飲用する。

【0041】

【製剤例3】 錠剤

(重量%)

アスタキサンチン	5
乳糖	80
重質酸化マグネシウム	15

20 を均一に混合し、1粒180mgの錠剤とした。

【0042】

【製剤例4】 散剤及び顆粒剤

(重量%)

アスタキサンチン	45
乳糖	40
デンプン	15

を均一に混合し、散剤又は顆粒剤とした。

【0043】

30 【製剤例5】 カプセル剤

ゼラチン	70.0%
グリセリン	22.9%
パラオキシ安息香酸メチル	0.15%
パラオキシ安息香酸プロピル	0.51%
水	適量
計	100%

上記成分からなるソフトカプセル剤皮の中に、オキアミ抽出油脂（ASTAX1700、アスタキサンチンジエステル1.7%含有）を常法により充填し、1粒180mgのソフトカプセルを得た。

【0044】

【製剤例6】 ドリンク剤

13

ビタミンE
シクロデキストリン
香料
塩化カリウム
硫酸マグネシウム

300 g
50 g
150 ml
10 g
5 g

上記の成分を配合し、水を加えて100リットルとした。このドリンク剤は、1回あたり約100mlを飲む。

*【0045】

【製剤例7】 滋養強壮強精剤

*

呈味：DL-酒石酸ナトリウム
コハク酸

1 g
0.09 g

甘味：液糖

8Kg

酸味：クエン酸

120 g

ビタミン：ビタミンC

100 g

ビタミンB1

20 g

ビタミンB2

20 g

ビタミンB6

20 g

ビタミンB12

20 g

葉酸

10 g

ニコチン酸

20 g

ビタミンE

300 g

シクロデキストリン

50 g

アスタキサンチン

10 g

香料

150 ml

塩化カリウム

10 g

硫酸マグネシウム

5 g

上記の成分を配合し、水を加えて100リットルとした。この滋養強壮強精剤は、1回あたり約100mlを飲む。

【0046】

【発明の効果】本発明の飲食物および医薬に含まれるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、実施例で述べたようにヒト血清LDLの酸化を低濃度で押さえ、かつヒト介入試験においても効果が認められる。とくに、このような効果を基礎とする本発明の医薬は、動脈硬化症、虚血性心疾患又は虚血性脳障害などの予防、防止剤としては従来のものと比較して作用メカニズムが異なる。しかも、アスタキサンチンは元来天然に存在する物質であり食経験もあることから、低毒性で安全性も高い※

14

※ことが容易に考えられ、飲食物及び医薬品としての意義も大きく、新たな食品、機能性食品及び医薬品の素材としての応用が期待できる。

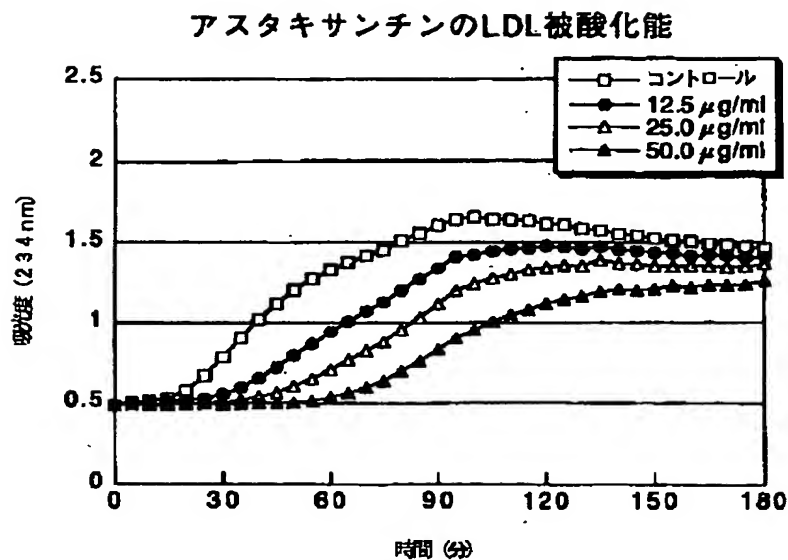
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はアスタキサンチンのLDL被酸化能（in vitro）を示したグラフである。

【図2】 図2はアスタキサンチン投与によるLDL被酸化能（in vivo）を示したグラフである。

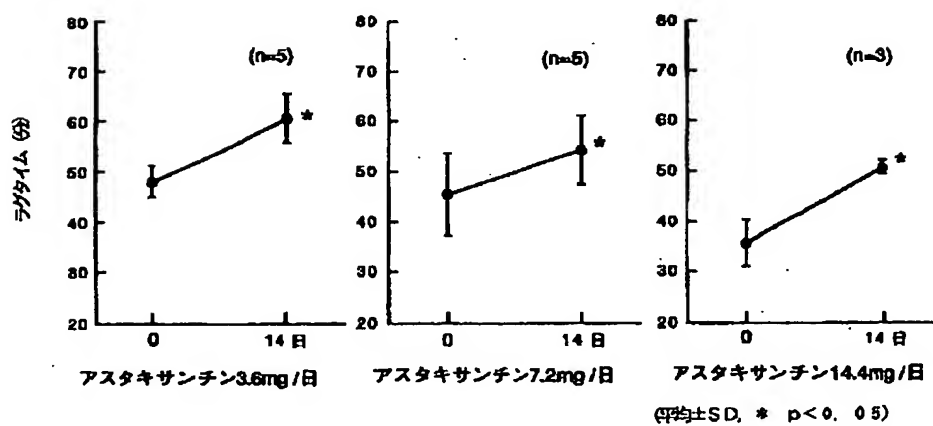
【図3】 図3はサルモネラ菌を用いた変異原性テストにおいて、アスタキサンチンが変異原性を示さず、むしろマイトマイシンCによって誘起される変異原性を抑制する様子を示したグラフである。

【図1】

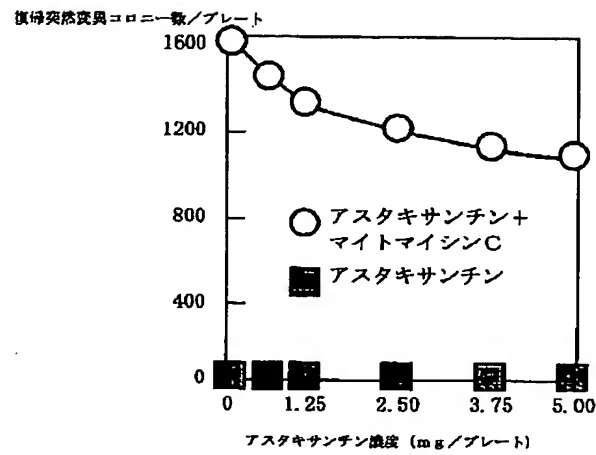


【図2】

アスタキサンチン投与によるLDLの被酸化能



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

A 6 1 K 31/215

35/56

35/74

C 0 7 C 403/02

識別記号

A B X

F I

A 6 1 K 35/56

35/74

C 0 7 C 403/02

A 2 3 L 2/00

D

F

(72) 発明者 近藤 和雄

東京都文京区湯島4-9-16

(72) 発明者 板倉 弘重

東京都練馬区早宮2-6-36